

IMMUNOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE

Publication number: JP62270532

Publication date: 1987-11-24

Inventor: TODA SHOZO; YAMAZAKI SUNAO; OKUBO AKIRA

Applicant: NODA SHOKKIN KOGYO; TODA SHOZO

Classification:

- international: **A61K31/715; A61K31/715; (IPC1-7): A61K31/715; A61K35/84**

- european:

Application number: JP19860115710 19860520

Priority number(s): JP19860115710 19860520

Report a data error here

Abstract of JP62270532

PURPOSE:The titled substance, containing a saccharide extracted from a specific mycelial culture and effective for chronic hepatitis B, etc. **CONSTITUTION:**A high polymer immunologically active substance obtained by containing a saccharide ($\geq 95\%$ contained glucide is neutral saccharide hardly containing acidic saccharide or amino sugar), extracted from a mycelial culture of SHIITAKE mushrooms cultivated in a solid culture medium, e.g. bagasse or rice bran, containing cellulosic components as a principal material or mycelial culture containing fruit bodies and having 6,000,000-1,500,000mol.wt. (fraction A; 42.8-53.6% glucide content and 28.0-37.4% protein content) and 1,500,000-800,000mol.wt. (fraction B; 52.3-66.3% glucide content and 16.0-23.6% protein content). The immunological activity is useful in activating macrophages, enhancing IL-1 productivity, mitogen activity, etc., in the fraction A and activating and enhancing action of the similar activities, other natural killer cells in the fraction B. Thereby this substance becomes useful as a remedy for immunological deficiency.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭62-270532

⑬ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)11月24日

A 61 K 35/84
31/715

A D Y
A B A

8615-4C
7252-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 免疫活性物質

⑯ 特 願 昭61-115710

⑰ 出 願 昭61(1986)5月20日

⑱ 発 明 者	戸 田 昭 三	茅ヶ崎市茅ヶ崎2-4-9-201
⑱ 発 明 者	山 崎 素 直	東京都世田谷区成城4-17-15
⑱ 発 明 者	大 久 保 明	東京都北区王子5-2-2-839
⑲ 出 願 人	野田食菌工業株式会社	野田市清水121番地
⑲ 出 願 人	戸 田 昭 三	茅ヶ崎市茅ヶ崎2-4-9-201
⑳ 代 理 人	弁理士 和田 成則	

明 細 書

1. 発明の名称

免疫活性物質

2. 特許請求の範囲

(1) 繊維素成分を主材とした固体培地にて培養された椎茸の菌糸体培養物あるいは子実体を含む菌糸体培養物から抽出した分子量600万~150万(A画分)および150万~80万(B画分)の糖を含む下記の性質を有する高分子免疫活性物質。

(イ) A画分の糖質含量は42.8~53.6%、蛋白質含量は28.0~37.4%。B画分の糖質含量は52.3~66.3%、蛋白質含量は16.0~23.6%。

(ロ) 含有糖質は酸性糖あるいはアミノ糖をほとんど含まず95%以上が中性糖。

(2) 前記固体培地はバガスと米糠からなる特許請求の範囲第1項記載の免疫活性物質。

3. 発明の詳細な説明

《発明の分野》

この発明はB型慢性肝炎等に有効な免疫活性物質に関するものである。

《発明の背景》

慢性肝炎患者は全国に110万人はいるといわれ、その約30%を占めるB型慢性肝炎は大部分が肝硬変へ移行し、さらに肝癌へと進行して死亡する率が高いウイルス性疾患である。また、B型肝炎ウイルス(HBV)に感染していながら全く肝炎症状を現さない健康保菌者が200万人も存在し、そのうちの約10%は慢性肝炎に移行するといわれており、これらの健康保菌者による水平感染や垂直感染(母児感染)によりHBVの感染が広がる危険性が高く、社会的に大きな問題となっている。近年HBVに対するワクチンが開発され、B型肝炎の予防に関しては今後大きな成果が期待できるが、既に発症した患者や健康保菌者からの発症に対しては現段階では有効な治療法が確立されておらず、治療法の確立が強く望まれている。

る。

B型肝炎はHBVの感染により肝障害が引き起こされる疾病であるが、無症候保菌者が多数存在することからHBV自身は肝細胞を破壊しないことは明らかであり、肝障害はHBVに対する宿主の免疫反応により起きると考えられている。すなわち、免疫系が正常であれば、HBV感染肝細胞に対し細胞性免疫が作動してこれを破壊するので肝炎が発症する。感染細胞が破壊されるとウイルスは血中へ放出されるが、同時に液性免疫が働いてHBVに対する抗体が産生され、HBVは完全に排除される。従って感染は持続せず急性肝炎の像を示し治癒する。ところが、HBVに対する免疫応答が低下していると、細胞性免疫が作動して感染細胞の排除が起こりその結果肝障害が生じるが、その排除が充分でないため感染細胞が残存する。また液性抗体の産生も充分でないのでHBVも完全に排除することができず、破壊された感染細胞から放出されたHBVが次々に他の肝細胞に

感染して破壊と感染を繰り返す状態に陥る。従って感染が持続し肝障害が慢性化する。また、HBVに対する応答が全く起きない場合は、細胞性免疫が働かず感染肝細胞は破壊されないが、液性抗体も産生されないのでHBVを排除できず、体内でHBVが増殖しているにもかかわらず全く肝炎が発症しない無症候保菌者となる。

以上述べたように、肝炎の発症は宿主がその免疫系によってHBVを排除しようとする生体の正の応答であるといえ、その免疫応答力の違いにより発症状態が異なってくると考えられている。すなわち、HBVに対する液性免疫、細胞性免疫の低下により持続感染が引き起こされB型慢性肝炎が発症すると考えられている。

ところで、近年担子菌から免疫系を活性化することにより抗腫瘍活性を現す β -D-グルカン系の多糖が次々と分離され、担子菌の持つ免疫賦活作用が注目されている。また食用茸である椎茸の菌糸抽出物より調製されたLEM(特公昭53-

- 3 -

- 4 -

23392)の免疫賦活能も注目され、それをふまえたB型慢性肝炎の治療が試みられ有効例が出されている(第71回日本消化器病学会総会、日本消化器病学会雑誌; Vol. 82, 1105(1985))。

前述したB型慢性肝炎の発症機序から、免疫系を活性化する物質が本症の治療に有効であることが考えられる。それゆえLEMから免疫活性物質を単離精製し治療剤として提供することは現在完全に有効な治療剤のないB型慢性肝炎あるいはその他の免疫不全症の治療剤として有用となる。

《発明の目的》

この発明は免疫系を活性化させることによりB型慢性肝炎あるいはその他の免疫不全症に対し有効な免疫活性物質を提供することを主な目的とする。

《発明の構成》

繊維素成分を主材とした固体培地にて培養された椎茸の菌糸体培養物あるいは子実体を含む菌糸

体培養物から抽出した分子量600万~150万(A画分)および150万~80万(B画分)の糖を含む下記の性質を有する高分子免疫活性物質。

(イ) A画分の糖質含量は42.8~53.6%、蛋白質含量は28.0~37.4%。B画分の糖質含量は52.3~66.3%、蛋白質含量は16.0~23.6%。

(ロ) 含有糖質は酸性糖あるいはアミノ糖をほとんど含まず95%以上が中性糖。

《発明の効果》

本物質はLEMを出発物質としてそこから精製する。LEMは椎茸菌(Lentinus edodes)を固体培地で培養し、子実体成形前に熱水抽出し(特公昭53-23392)、乾燥した粉末である。本発明を構成する物質の免疫活性は出発物質のLEMに比べ随くほど強くなっており、例えばmitogen活性においては現在知られている代表的なmitogenであるLPS(リボポリサッカライド)をはるかに凌ぐほどで

ある。

本物質の有する代表的な免疫活性は、A画分においてはマクロファージの活性化、IL-1（インターロイキン1）産生能、mitogen活性、LPS誘導B細胞幼若化、抗体産生能、キラーT細胞の活性化の何れの免疫作用をも活性化、増強する作用を有する。またB画分においてはマクロファージの活性化、IL-1産生能、mitogen活性、LPS誘導B細胞幼若化、抗体産生能、ナチュラルキラー細胞の活性化の何れの免疫作用をも活性化、増強する作用を有する。

それゆえ本物質は現在完全に有効な治療剤のないB型慢性肝炎あるいはその他の免疫不全症の治療剤として有用となると考えられる。

以下に本発明を構成する免疫活性物質の調製法を実施例により、さらに本物質の有用性を試験例により説明する。

《実施例》

本物質のLEMよりの調製法

- 7 -

cm) にかける。溶出液は50mMリン酸緩衝液pH6.7である。溶出曲線を図1に示す。縦軸は280nmの吸収を対数で表し、横軸は溶出体積を表わす。図1中のa, b, cで示した位置は分子量マーカーの溶出場所で、添え数字は分子量を万単位で表したものである。aは分子量200万のブルーデキストラン、bは分子量67万のチログロブリン、cは分子量46万のフェリチンである。図1中の斜線を付けたA、B画分が、それぞれ分子量600万～150万および150万～80万の糖を含む本発明を構成する高分子免疫活性物質である。A画分、B画分の収量はそれぞれ6mgおよび17mgであった。

次に本発明の免疫活性物質および出発物質であるLEMの糖含量ならびに蛋白含量を表1に示す。

ただし総糖質の定量はグルコースを標品としたフェノール硫酸法（M. Duboisら, Anal. Chem. 28巻、350頁 1956年）、酸性糖の定量はグルクロン酸を標品としたBlu-

menkrantzらの方法（N. Blumenkrantzら, Anal. Biochem., 54巻、484頁 1973年）、アミノ糖の分析はアルジトールアセテート誘導体によるガスクロマトグラフィー（R. Gattら, Anal. Biochem., 15巻、167頁 1966年）で行ない、蛋白質の定量は牛血清アルブミンを標品としたローリー法（O. H. Lowryら, J. Biol. Chem. 193巻、265頁 1951年）で行なった。

表1 糖含量ならびに蛋白含量（重量%）

	A画分	B画分	LEM
総糖含量	48.2±5.4	59.3±7.0	40.4±4.2
酸性糖	N.D.	N.D.
アミノ糖	0.5±0.5	2.2±2.0
蛋白含量	32.7±4.7	19.8±3.8	29.3±3.9

N.D.：検出されず。

- 10 -

- 9 -

次に本免疫活性物質の主成分を成す中性糖の組成の一例をLEMと比較して表2に示す。

ただし糖組成の分析はアルジトールアセテート誘導体としたGC-MSで行なった(P. Albersheimら、Carbohydr. Res., 5巻、340頁 1967年)。

表2 糖組成(モル%)

	A画分	B画分	LEM
アラビノース	9.1	9.4	36.6
キシロース	18.8	18.6	33.8
マンノース	20.2	6.0	6.8
ガラクトース	12.9	4.4	8.2
グルコース	39.0	61.6	13.9

試験例1 本物質のマクロファージ活性化能の検定

マクロファージは抗原を免疫系へ提示するいわば免疫系の窓口にあたる細胞で、免疫応答に際し

- 11 -

浄する。洗浄した細胞はRPMI 1640培地に懸濁し、96穴プレートに1穴当たり 2×10^5 個分注し、1時間培養した後プレートを軽く揺すってから上清を吸い出し、非付着性の細胞を除く。これに前述したRPMI 1640を180 μ l加え、さらに本物質をリン酸緩衝液に溶かした後0.22 μ mのメンブランフィルターにより濾過滅菌した溶液を20 μ l加えて全量を200 μ lとする。38℃で48時間培養後、培養上清を10 μ l採取し、グルコースオキシダーゼ法(グルコースB-テストワコー：和光純薬)により発色させ、505nmの吸光度(A_{505})よりグルコース含量を測定した。活性化指数S. I. (%)は次式に従い算出した。

S. I. (%)

$$= \frac{\text{培地の } A_{505} - \text{実験区の } A_{505}}{\text{培地の } A_{505} - \text{対照区の } A_{505}} \times 100$$

結果を図2に示す。両画分ともLEMに比べ大

- 13 -

極めて重要な役割を担っている。マクロファージの活性化には幾つかの段階があるといわれ、その最初の段階の活性化に伴いグリコリシスが亢進することが知られている。そこで、本物質のマクロファージ活性能を、対照に対するグルコース消費量の増加として評価し、活性化指数(S. I. %)として求めた。

ddyマウス雄6~8週令の腹腔内に滅菌した10%チオグリコール酸培地(日水製薬)を1ml注射し、滲出性のマクロファージを誘導する。4日後にマウスを屠殺し、10unit/mlのヘパリンを含有するCMF-HBSS(Ca^{2+} 、 Mg^{2+} free Hank's balanced salt solution)をシリンジを用いて約5ml腹腔内に入れた後、バスツールピペットで腹腔内より細胞を含む溶液を吸い出し、150メッシュのフィルターを通して遠沈管に受ける。800回転5分間遠心し、上清を吸い取り5mlのヘパリンを含まないHBSSで細胞を洗

- 12 -

幅な活性の増大が観測され、強いマクロファージ活性化能の知られているLPSを凌ぐほどであった。

試験例2 本物質のmitogen活性の検定

リンパ球は抗原や種々のmitogen(分裂促進物質)の刺激により幼若化し芽球様の大型細胞に変化する。現在mitogenとしては種々の物質が知られている。代表的なものとしてB細胞に特異的に反応するLPS、T細胞に特異的に反応するPHAなどがある。これらの刺激によりリンパ球はDNA合成が亢進し細胞分裂が起こることが知られている。そこでDNA合成量を 3H -thymidineの細胞内への取り込み量で評価し、本物質のmitogen活性を検定した。

BALB/c雄マウス(6~8週令)より脾臓を採取し、細胞塊をよくほぐしEagle's MEM中に懸濁する。150メッシュのフィルターを通した後細胞をよく洗浄し96穴プレートに

- 14 -

1穴当たり 5×10^5 個の細胞を分注する。本物質の溶液を加えて全量を $200 \mu\text{l}$ とし、72時間培養する。培養終了後1穴当たり $0.2 \mu\text{Ci}$ の ^3H -thymidineを加え全量を $250 \mu\text{l}$ とする。培養終了後、cell harvesterを用いて細胞をグラスフィルターにトラップする。グラスフィルターを乾燥した後、液体シンチレーションカウンターで細胞内に取込まれた放射活性を計測する。実験は全て4連で行ない、対照区のカウント数(dpm)に対する実験区のカウント数の割合を活性化指数(S. I. %)として表わす。

結果を図3に示す。

両画分とも強いmitogen活性を示し、その活性は代表的なB細胞mitogenであるLPSがS. I. 175%であるのに対し、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のA画分では962%、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のB画分では1166%と著しく強いものであった。なお両画分は試験例1で明らかなようにマク

- 15 -

実験系にmitogenとして $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSを添加して幼若化反応を引き起こさせ、そこに本物質の溶液を加えてmitogenによる幼若化反応の変化を調べた。その際、本物質自体がmitogen活性を持つことを考えてmitogenを加えない群をそれぞれ対照として置き、これを差し引くことによりmitogenに由来する幼若化を修飾する作用を評価した。修飾指数(S. I. %)は次式に従い算出した。

S. I. (%) =

$$\frac{(\text{mitogen}+, \text{sample}+) \text{区} - (\text{mitogen}-, \text{sample}+) \text{区}}{(\text{mitogen}+, \text{sample}-) \text{区} - (\text{mitogen}-, \text{sample}-) \text{区}} \times 100$$

結果を図4に示す。

LPSによる幼若化に対しては両画分ともに強力な促進活性を示し、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のB画分においては8倍近い促進が見られた。すなわち両画分ともにB細胞の増殖を促進し、更に、既に幼若化を起こしたB細胞に作用してその増殖を更に増

- 17 -

ロファージを強く活性化する作用を持つ。そしてこの活性化したマクロファージがリンホカインを放出し、これがリンパ球の幼若化を引き起こすことが知られている。そこでマクロファージを除いた系で同様の活性を検定したが、本物質のmitogen活性は低下しなかった。それゆえ本物質のリンパ球幼若化はマクロファージを経由せずに直接リンパ球に作用していると考えられる。

試験例3 本物質のLPSによる幼若化反応の修飾作用

試験例2で両画分がリンパ球を幼若化させる作用を持つことが明らかとなったが、この作用の特異性を検定した。B細胞に特異的に作用するmitogenであるLPSによる幼若化に対する修飾作用について調べた。すなわち、LPSによる幼若化を促進すればB細胞に作用していることになる。

試験例2と同様にマウス脾臓細胞の系を用いて

- 16 -

強する作用を持つことがわかった。

安全試験

出発物質であるLEMの毒性試験を野村生物科学研究所に依頼し、同所にて動物で「急性毒性試験」および「亜急性毒性試験」を行ない、更に残留農薬研究所で「変異原性試験」が実施され、本物質の安全性が確認されている。

これらの結果に基づいて出発物質であるLEMを健康者に与え、副作用症状、臨床検査異常等を検討するため第1相試験を行なった。被検者は希望した成人男子5名および女子4名で健康診断の結果、健康と診断された者である。単回投与分は1回6g投与した。更に単回投与後、男子5名は1日6gずつ連続投与し、その1か月後、6か月後に一般検査、臨床検査、心電図、自覚症状等の諸検査を行なった。その結果本物質の影響と思われる異常値および副作用は全く見られなかった。

以上の試験結果から、本物質の出発物質であるLEMの安全性が確認された。

- 18 -

4. 図面の簡単な説明

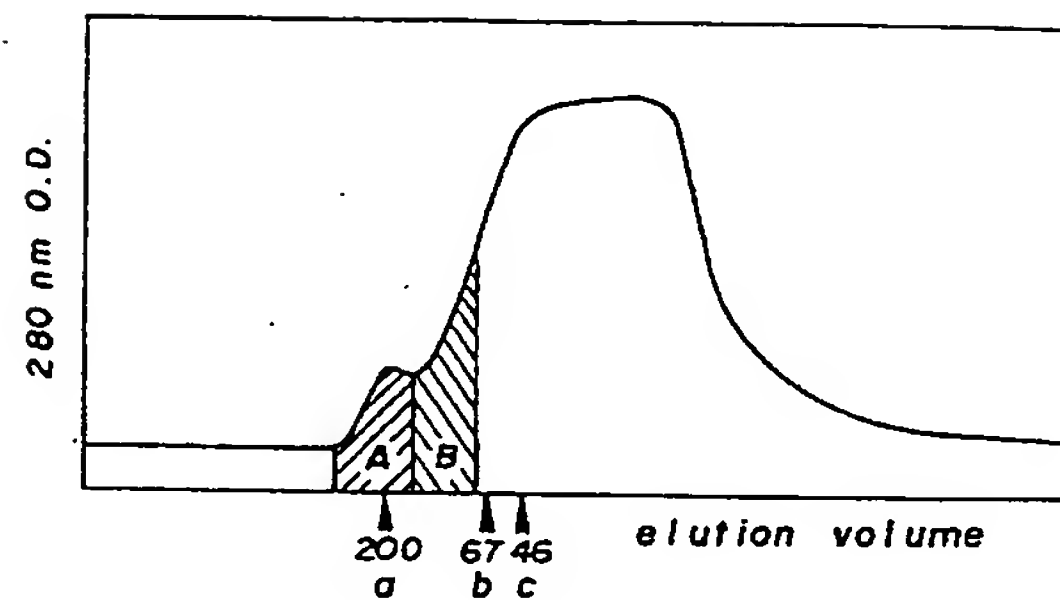
第1図はA画分とB画分のトヨパールHW-65Sによるゲル濾過の溶出曲線、第2図はA画分、B画分のマクロファージ活性化能を示す棒グラフ、第3図はA画分、B画分のmitogen活性を示した棒グラフ、第4図はA画分、B画分のLPSによって誘導されたB細胞幼若化に対する修飾作用を示した棒グラフである。

特許出願人 野田食菌工業株式会社

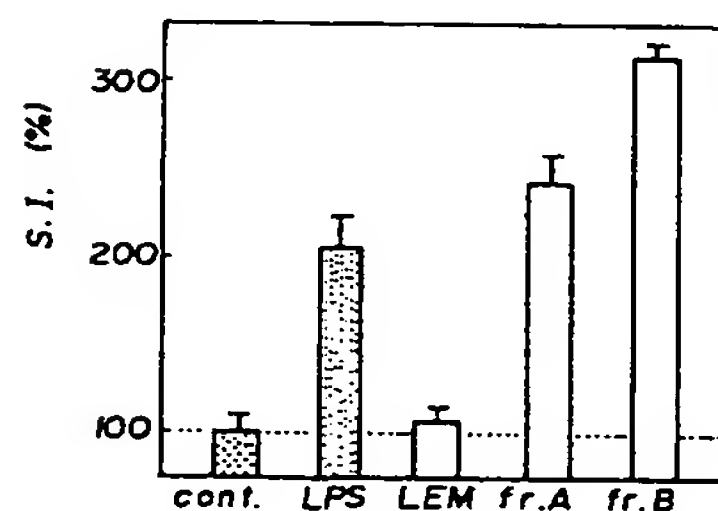
戸 田 昭 三

代理人 弁理士 和 田 成 則

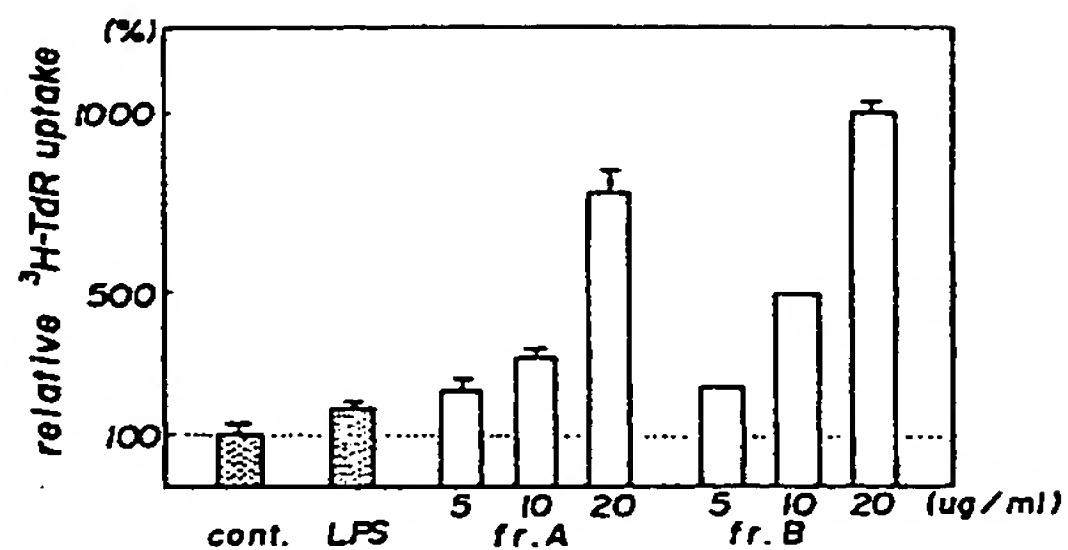
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第 4 図

